

Aus dem Institut de Médecine et de Chirurgie expérimentales, Université de Montréal,
Montreal, Canada (Direktor: Prof. Dr. HANS SELYE)

Histochemische Studien über die Beteiligung der Mastzellen bei der Calciphylaxie*

Von

HANS SELYE, PIER LUIGI CARUSO und BEATRIZ TUCHWEBER

Mit 12 Textabbildungen, davon 4 farbigen

(Eingegangen am 28. Februar 1964)

Die Calciphylaxie ist eine durch einen doppelten Mechanismus erzeugte Reaktionsform; um sie auszulösen, ist sowohl die Sensibilisierung mit einem mittelbar auf sämtliche Gewebe einwirkenden Verkalkungstoff (z.B. Vitamin D-Derivate, Nebenschilddrüsenhormon) als auch die Provokation („challenge“) mit gewissen mechanischen oder chemischen Agenzien notwendig. Verkalkung entsteht dann dort, wo der provozierende Reizstoff mit sensibilisiertem Gewebe in Berührung kommt (SELYE 1962).

Calcergie oder direkt ausgelöste Calcinose ist ein grundverschiedenes Phänomen. Es wird im unvorbehandelten Organismus durch sog. direkte Verkalkungstoffe oder Calcergene (z.B. verschiedene Schwermetalle) erzeugt. Diese rufen schon ohne vorhergehende Sensibilisation im Gewebe, mit dem sie in Berührung kommen, Verkalkung hervor (SELYE et al. 1962).

Unsere früheren Versuche haben bereits gezeigt, daß bei gewissen Formen von Calciphylaxie und Calcergie, bei denen intravenös verabreichte Metallverbindungen als calciphylaktische Provokatoren bzw. Calcergene benützt werden, die Mastzellen eine entscheidende Rolle spielen. Hier sprechen wir demgemäß von Mastocalciphylaxie, respektive Mastocalcergie (SELYE et al. 1964). Wenn z.B. einer mit Nebenschilddrüsenextrakt calciphylaktisch sensibilisierten Ratte ein metallischer Provokator (z.B. FeCl_3) intravenös verabreicht wird, erzeugt die subcutane Injektion eines Mastzellenentladners (z.B. Polymyxin) eine lokale Eisenablagerung, die sekundär zur Calciumausfällung führt. Hier handelt es sich um Mastocalciphylaxie (SELYE 1962). Falls andererseits einem nicht sensibilisierten Tier ein Calcergen (z.B. Bleiacetat) intravenös und gleichzeitig ein Mastzellenentladungstoff subcutan injiziert werden, so bildet sich auch an der Injektionsstelle eine lokale Bindegewebsverkalkung aus. In diesem Falle handelt es sich um Mastocalcergie (SELYE et al. 1962).

Histochemische Untersuchungen haben nun gezeigt, daß bei einer derartigen Calcergie die aus den Zellen entladenen Mastzellgranula sich erst mit Blei inkrustieren (Rhodizonatreaktion) und daß dieses Metall sekundär Phosphat und Carbonat (von Kóssa-Methode) und Calcium (Chloranilsäuretechnik) anzieht. Später zerfallen die so gebildeten, verkalkten Mastzellgranula in ein feines, staubartiges Präzipitat, das sich an die Bindegewebsfasern anlegt (SELYE et al. 1964).

* Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des „National Cancer Institute of Canada“, der „Benger Laboratories Limited“, Holmes Chapel, England, und der „Canadian Arthritis and Rheumatism Society“ ausgeführt. Für das Polymyxin-B-Sulfat sind wir der Firma „Pfizer Company Limited“, Montreal, verpflichtet.

Wir wollten nun mit histochemischen Methoden die Morphogenese der einfachen Calciphylaxie und der Mastocalciphylaxie näher untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde bei der mit Dihydratichysterin (DHT) sensibilisierten Ratte entweder durch subcutane Injektion von FeCl_3 eine einfache lokale Calciphylaxie erzeugt oder durch intravenöse Injektion von FeCl_3 mit nachfolgender subcutaner Verabreichung von Polymyxin eine Mastocalciphylaxie hervorgerufen. Dann wurden die Veränderungen in den Mastzellen und Bindegewebsfasern untersucht, die unter diesen Umständen durch Spezialfärbungen für Metachromasie, Eisen, Calcium, Phosphat und Carbonat nachgewiesen werden können.

Versuchsgut

75 weibliche Sprague-Dawley-Ratten des Holtzman-Stammes mit einem mittleren Körpergewicht von 98 g (95–102 g) wurden für zwei Versuchsserien in 15 gleiche Gruppen eingeteilt.

In der ersten Serie verabreichten wir 1 mg Dihydratichysterin, „DHT“ (Calcamin-® Dr. A. WANDER A.G., Bern, Schweiz) in 0,5 cm³ Maisöl durch die Schlundsonde am 1. Tag. Dann wurde 50 µg Eisenchlorid ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Fisher Scientific Co., New York, USA) in 0,2 cm³ Wasser sowohl unter die Rücken- als auch unter die Bauchhaut am 2. Tag injiziert, um zwei Verkalkungsherde zu erzeugen.

In der 2. Versuchsserie wurden alle Ratten auch mit DHT in der oben beschriebenen Weise behandelt. Am folgenden Tag injizierten wir 2 mg FeCl_3 in 1 cm³ Wasser intravenös und sofort danach Polymyxin-B-Sulfat (PFIZER, Montreal, Canada) in der Dosis von 10 µg am Rücken und Bauch, oder 500 µg nur am Rücken, immer in 0,2 cm³ Wasser, subcutan.

Während des Versuches wurden die Ratten ausschließlich mit Purina Laboratory Chow (Purina Company of Canada) ernährt. In beiden Versuchsserien töteten wir je 5 Tiere durch Dekapitation 5 min, 60 min, 5 Std, 24 Std, respektive 5 Tage nach den subcutanen Injektionen. Die Haut und das subcutane Bindegewebe der Injektionsstellen fixierten wir in Alkohol-Formol (4 Teile absoluter Alkohol und ein Teil 10%iges neutrales Formalin) zur Einbettung in Paraffin und nachfolgender Färbung mit der von Kóssa-Methode für den Nachweis von Phosphat und Carbonat und der Chloranilsäuremethode für Calcium. Beide diese Verfahren kombinierten wir mit einer Azur-A-Gegenfärbung für metachromatisches Material. Zum Nachweis von Eisen benutzten wir die Berliner-Blau-Reaktion mit Neutralrot als Kontrastfärbung.

Versuchsergebnisse

Erste Versuchsreihe. *Einfache Calciphylaxie bei der mit DHT sensibilisierten Ratte durch subcutane Injektion von FeCl_3 hervorgerufen.* Fünf Minuten bzw. eine Stunde nach der subcutanen Injektion von FeCl_3 konnten wir mit unseren Methoden an der Injektionsstelle nur Eisen nachweisen. Die Bindegewebsfasern waren stark mit der Berliner-Blau-Reaktion färbbar, während die Phosphat + Carbonat- und Calciumreaktionen noch negativ ausfielen (Abb. 1). Nach 5 Std waren im selben Bereich schon Spuren von Phosphat oder Carbonat, aber noch kein Calcium zu sehen. Nach 24 Std wurde die Phosphat + Carbonatreaktion noch intensiver, und zwar nicht nur an der mit Berliner Blau färbbaren subcutanen Injektionsstelle, sondern auch an den Bindegewebsfasern des Derma außerhalb der Hautmuskulatur, wo kein Eisen zu sehen war (Abb. 2 und 3). Anscheinend ruft hier das verabreichte Eisenpräparat nicht nur eine streng auf die Injektionsstelle lokalisierte Gewebsmineralisierung hervor, sondern löst eine Kettenreaktion aus, die sich sekundär auch auf das benachbarte Gewebe ausdehnt. Zu dieser Zeit begann auch schon die Calciumreaktion positiv auszufallen, und zwar in demselben Bereich, in dem der Phosphat-Carbonatniederschlag entstand. Demgegenüber wurde die Eisenreaktion um so schwächer, je stärker die

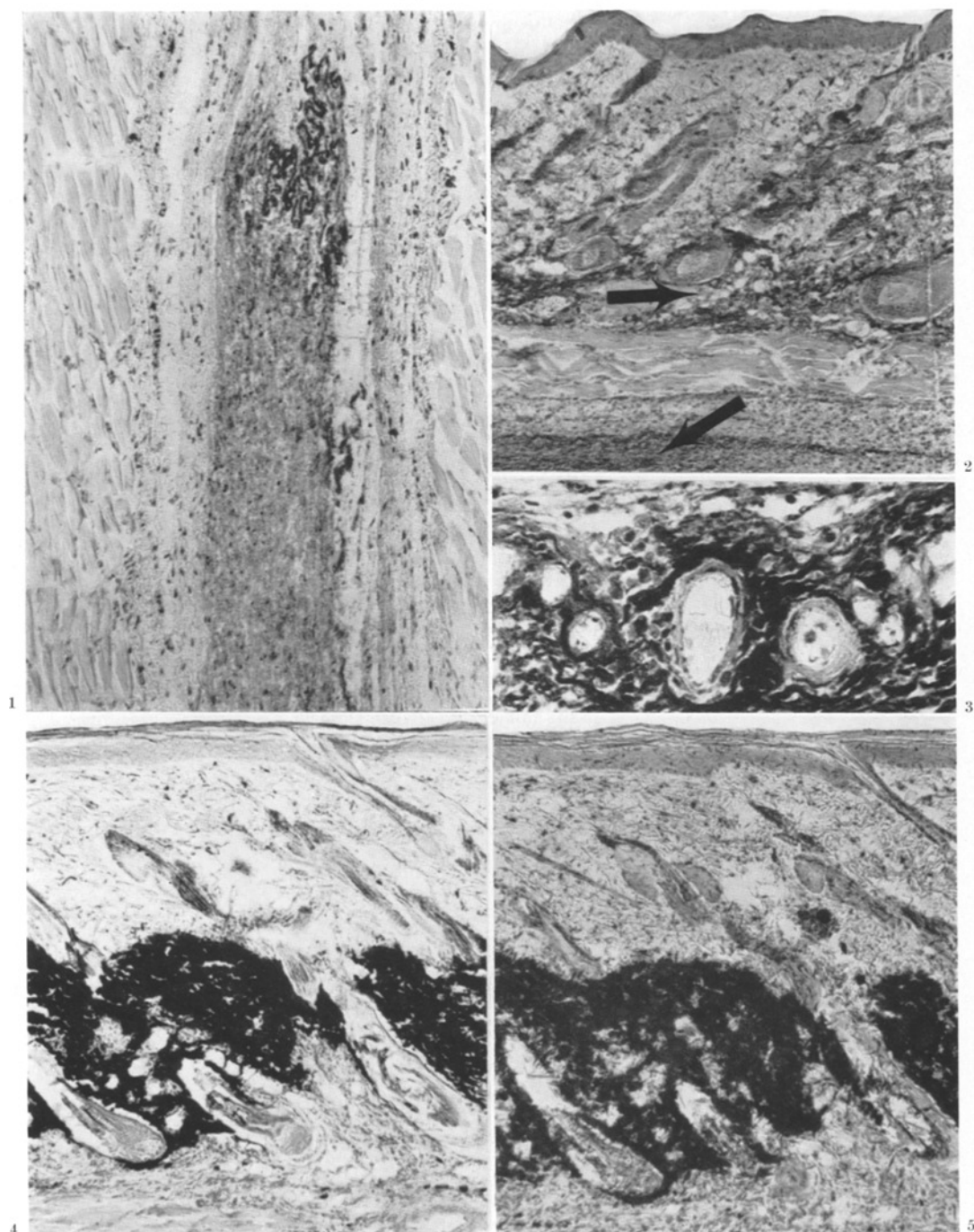


Abb. 1—5 (Legenden s. S. 541)

Phosphat+Carbonat- und Calciumreaktion ausfiel. Nach 6 Tagen war nurmehr sehr wenig Eisen nachweisbar, während die Calcium- und Phosphat+Carbonatreaktion sowohl bezüglich ihrer Intensität als auch ihrer Ausbreitung maximal

ausfiel (Abb. 4 und 5). In diesem Stadium war die gesamte injizierte Region starr verkalkt, und histologisch konnte man eine Nekrose, oft mit Zerfall des Oberflächenepithels einhergehend, nachweisen.

Bei all diesen Veränderungen waren die Mastzellen offensichtlich sehr wenig und anscheinend nur sekundär betroffen. Wohl sahen wir in der Injektionsstelle selbst einige degranulierte Mastzellen, aber die entladenen Granula färbten sich nur metachromatisch mit Azur-A, nicht aber mit den Spezialfärbungen für Eisen, Phosphat+Carbonat oder Calcium.

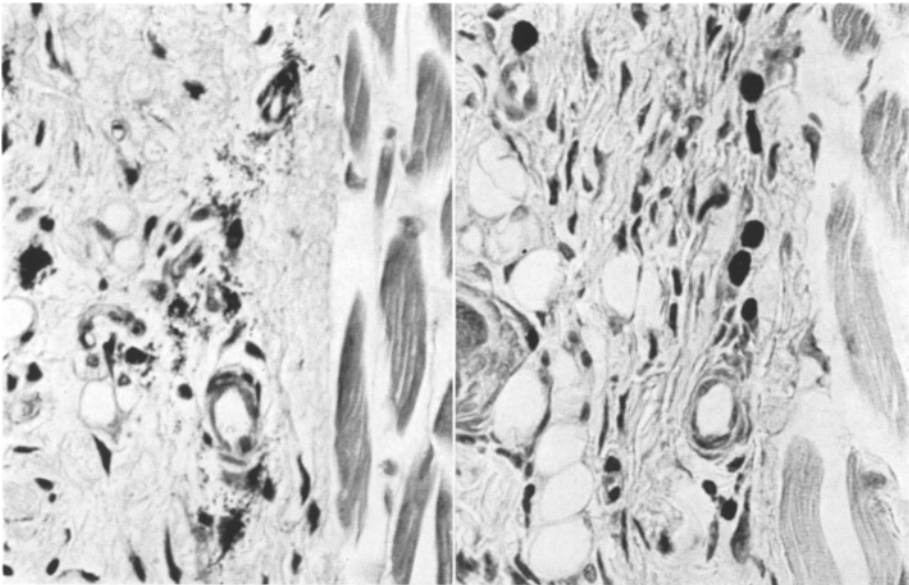


Abb. 6

Abb. 7

Abb. 6. Fünf Minuten nach Polymyxininjektion sieht man bereits weitgehende Degranulation der perivaskulären subcutanen Mastzellen, jedoch keine Phosphat+Carbonatreaktion (von Kössa-Azur A, Vergr. 437 ×)

Abb. 7. Eine der in Abb. 6 dargestellten entsprechende, aber von der Polymyxininjektionsstelle entfernte Region. Hier sind die perivaskulären Mastzellen normal (von Kössa-Azur A, Vergr. 437 ×)

Zweite Versuchsreihe. Mastocalciphylaxie bei der mit DHT sensibilisierten Ratte durch intravenöse Verabreichung von FeCl_3 und subcutane Injektion von Polymyxin hervorgerufen. Bei den mit 10 µg Polymyxin injizierten Ratten sahen wir bereits nach 5 min eine weitausgedehnte Mastzellendegranulation an der Injektionsstelle (Abb. 6 und 7); gleichzeitig begann die Berliner-Blau-Reaktion

Abb. 1. Eine Stunde nach der subcutanen Injektion von FeCl_3 weist die Injektionsstelle, hier zwischen zwei Schichten der Hautmuskulatur, eine intensiv blaue Eisenreaktion auf, färbt sich jedoch noch nicht mit den Phosphat- und Calciummethoden (Berliner Blau-Neutralrot, Vergr. 108 ×)

Abb. 2. 24 Std nach der FeCl_3 -Injektion färbt sich nicht nur die Injektionsstelle unterhalb der Hautmuskulatur (unterer Pfeil), sondern auch die Bindegewebsfasern des Derma (oberer Pfeil), die nicht direkt mit Eisen behandelt wurden (von Kössa, Vergr. 108 ×)

Abb. 3. Subcutane Injektionsstelle des in Abb. 2 dargestellten Präparates. Hier, in der Gegend der FeCl_3 -Injektion, geben die Bindegewebsfasern eine besonders starke Phosphat+Carbonatreaktion (von Kössa-Azur A, Vergr. 414 ×)

Abb. 4. Am 6. Tag nach der FeCl_3 -Injektion weist das dermale Bindegewebe rund um die Haarfollikel starke Phosphat+Carbonatreaktion auf (von Kössa-Azur A, Vergr. 108 ×)

Abb. 5. Ein dem in Abb. 4 dargestellten nahestehender Schnitt, auf Calcium gefärbt. Der für die Chloranilsäure-Reaktion charakteristische grobkristalline Niederschlag entspricht genau den mit der von Kössa-Reaktion gefärbten Gebieten (Chloranilsäure-Methode, Vergr. 120 ×)

in den Wandungen der Arteriolen und gelegentlich auch in den capillaren und postcapillaren Venen positiv auszufallen.

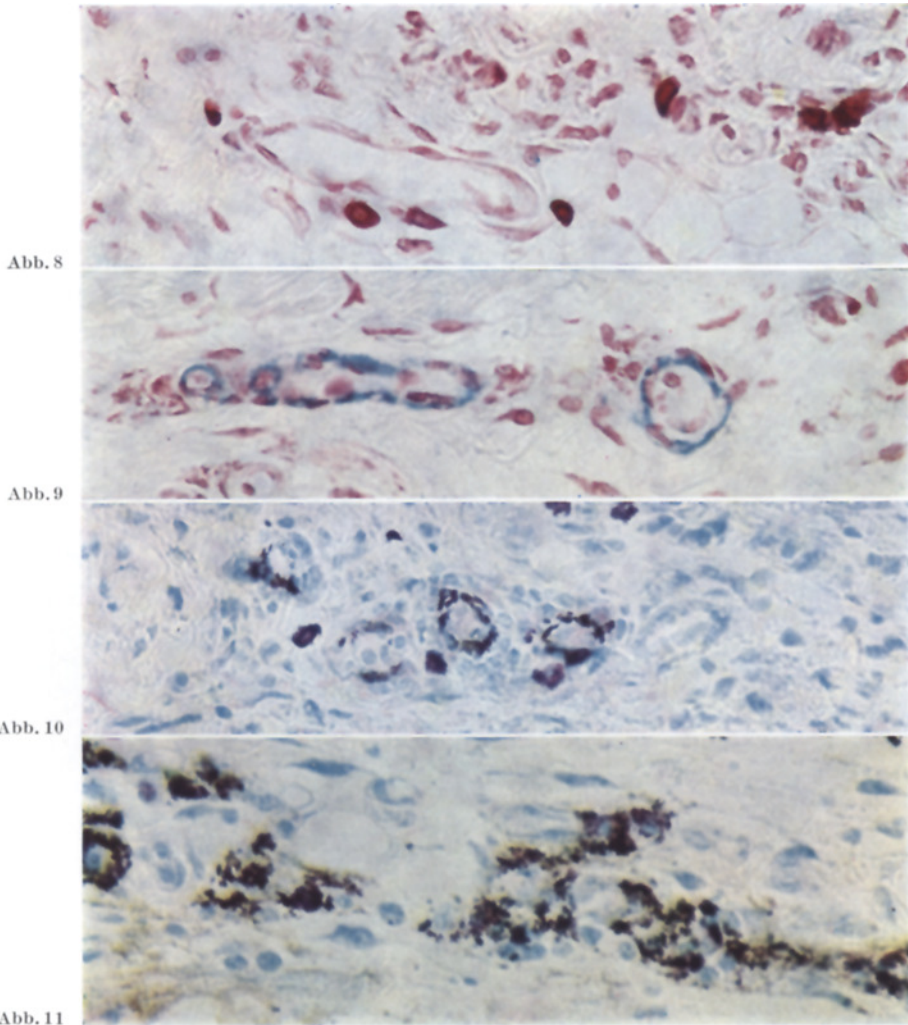


Abb. 8. In dem von der Polymyxininjektionsstelle entfernten Subcutangewebe sind die Mastzellen nicht degranuliert, und die Wandung des kleinen Blutgefäßes weist keine Eisenablagerung auf (Berliner Blau-Neutralrot, Vergr. 460 ×)

Abb. 9. An der Polymyxininjektionsstelle selbst sind die Mastzellen degranuliert und die Wände der kleinen Subcutangefäße stark mit Eisen imprägniert. 5 min nach Polymyxininjektion (Berliner Blau-Neutralrot, Vergr. 460 ×)

Abb. 10. 24 Std nach der Polymyxininjektion weisen die ursprünglich mit Eisen imprägnierten kleinen Blutgefäße in der Injektionsstelle bereits eine starke Phosphat+Carbonatreaktion auf (von Kössa-Azur A, Vergr. 460 ×)

Abb. 11. Nach Verabreichung hoher Dosen von Polymyxin (500 µg) sieht man, daß viele der entladenen metachromatischen Mastzellgranula (violett) sich mit Calciumverbindungen (dunkelbraun oder schwarz) imprägnieren (von Kössa-Azur A, Vergr. 460 ×)

Nach 60 min war diese Reaktion noch stärker ausgebildet (Abb. 8 und 9), aber Phosphat+Carbonat oder Calcium konnte noch nicht nachgewiesen werden. Die ersten Spuren von mit der von Kössa-Methode färbbarem Material (Phos-

phat oder Carbonat) erschienen 5 Std nach der Polymyxininjektion, und zwar nur in den Wandungen der kleinsten Gefäße des Injektionsbereiches, wo vorher eine positive Eisenreaktion nachweisbar war. In der umgebenden, nicht injizierten Haut konnten wir weder Mastzelldegranulation noch Phosphat oder Carbo-

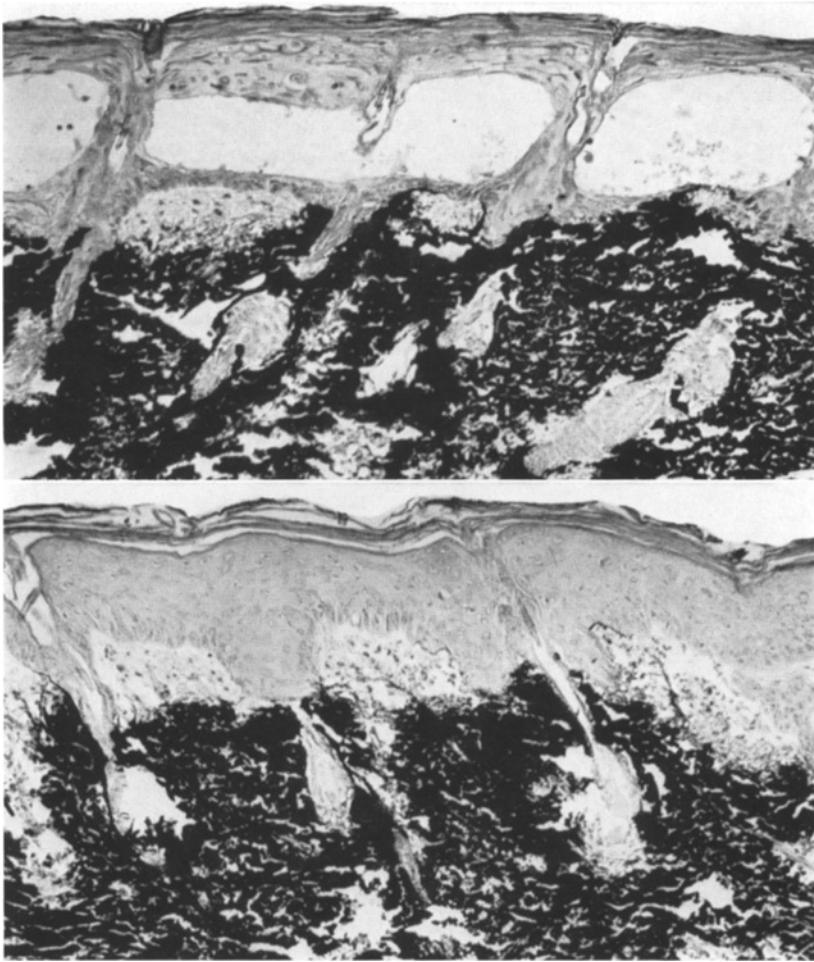


Abb. 12. Sechs Tage nach der Polymyxininjektion ist schon fast das gesamte dermale Bindegewebe bis ans Epithel von Kóssa-positiv. An manchen Stellen (oben) sehen wir auch intraepitheliale, mit Flüssigkeit gefüllte Blasen, während diese an anderen Stellen (unten) fehlen (von Kóssa-Azur A, Vergr. 120 ×)

nat an den Gefäßwandungen nachweisen. Nach 24 Std wurde die Phosphat+Carbonatreaktion an den Gefäßwänden noch stärker (Abb. 10) und führte in vielen Fällen zu einem mehr oder weniger fortgeschrittenen Zerfall der betroffenen Blutgefäße. Gleichzeitig begann eine Phosphat+Carbonatablagerung an den benachbarten Bindegewebsfasern der Injektionsstelle, während die Eisenfärbung fortschreitend schwächer wurde. Zu diesem Zeitpunkt fing im Injektionsbereich auch die Calciumreaktion an, positiv auszufallen.

Nach 6 Tagen waren die Calcium- und Phosphat+Carbonatreaktionen maximal ausgebildet (Abb. 12), während die Eisenreaktion fast vollkommen verschwand.

Obwohl der Verkalkungsprozeß sich immer streng auf die durch den Mastzellenentlader (Polymyxin) behandelte Region beschränkte, waren merkwürdigerweise auch in dieser Versuchsreihe keine Eisen-, Phosphat+Carbonat- oder Calciumablagerungen an den entladenen Mastzellgranula selbst nachweisbar.

Es erschien uns jedoch sehr unwahrscheinlich, daß bei einer derartigen mastocalciphylaktischen Reaktion unter günstigen Versuchsbedingungen eine Verkalkung der Mastzellgranula nicht nachweisbar sein sollte. Möglicherweise wirkt eine kleine Dosis von 10 μ g Polymyxin zu langsam. Wir wiederholten den Versuch daher mit einer einzigen subcutanen Injektion von 500 μ g Polymyxin (unter sonst gleichen Bedingungen), um eine stürmischere Verkalkungsreaktion hervorzurufen. Hier sahen wir wieder eine anfängliche Eisenablagerung in den Wandungen der kleinen subcutanen und dermalen Gefäße, die allerdings viel stärker ausfiel als nach 10 μ g Polymyxin und manchmal auch die benachbarten Bindegewebsfasern betraf. Wie im vorigen Versuch traten die ersten Spuren des mit der von Kóssa-Methode färbbaren Materials nach 5 Std in den eisenimprägnierten Gebieten auf, aber nach 24 Std entstand hier auch noch eine starke Verkalkung der entladenen Mastzellgranula (Abb. 11). Nach 6 Tagen waren wieder alle Bindegewebsfasern in der Injektionsgegend wie im vorigen Versuch (Abb. 12) aber in noch größerer Ausdehnung verkalkt.

Besprechung

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß die gewöhnliche Calciphylaxie und die Mastocalciphylaxie tatsächlich *grundverschiedene Reaktionstypen* darstellen. Bei der *einfachen Calciphylaxie* — wie sie z.B. durch lokale FeCl_3 -Injektion im subcutanen Bindegewebe der mit DHT sensibilisierten Ratte hervorgerufen wird — zieht das eisenimprägnierte Bindegewebe von Kóssa-positives Material (Phosphat, Carbonat) und durch Chloranilsäure nachweisbares Calcium an. Diese Verkalkung bleibt jedoch nicht auf die direkt durch Eisen imprägnierten Bindegewebsfasern beschränkt; sie breitet sich auch in die Umgebung aus. Hierbei sind die Mastzellen nicht oder wenigstens nur sehr geringgradig beteiligt.

Bei der *Mastocalciphylaxie* hingegen spielen die Mastzellen eine entscheidende Rolle, indem sie das intravenös verabreichte Eisen in den Injektionsbereich anziehen und so trotz allgemeiner Provokation („systemic challenge“) eine lokale Verkalkung auslösen. Hierbei gelingt es mit entsprechenden histochemischen Methoden nachzuweisen, daß schon ganz kleine Mengen von Polymyxin in den Wandungen der kleinsten Gefäße erst Eisenablagerungen hervorrufen, die dann sekundär verkalken. Die Beteiligung der Mastzellen erscheint hier nur deshalb wahrscheinlich, weil bei dem calciphylaktisch sensibilisierten Tier nach intravenöser Eisenverabreichung nur dort Gewebsverkalkung entsteht, wo ein Mastzellenentlader injiziert wird und die perivaskulären Mastzellen sich nachweisbar degranulieren. Die Beteiligung des metachromatischen Materials selbst bleibt problematisch. Es könnte jedoch angenommen werden, daß nach Verabreichung kleiner Mengen von Polymyxin die freiwerdenden Mastzellgranula in mikroskopisch nicht mehr nachweisbare Teilchen zerfallen bevor sie noch verkalken, so daß die Kalkablagerung erst am Erfolgsorgan (Gefäßwände, Bindegewebsfasern) histochemisch erfaßt werden kann. Jedenfalls gelingt es, durch Verabreichung viel stärkerer Dosen von Polymyxin unter sonst gleichen Bedingungen

eine so stürmische Verkalkungsreaktion auszulösen, daß die Mastzellgranula sofort nach ihrem Austritt aus der Zelle, noch vor ihrer Auflösung, sich mit Kalk in histochemisch nachweisbarer Form beladen und erst später zerfallen.

Unsere Beobachtungen sind am besten durch die Annahme zu erklären, daß bei der Mastocalciphyllaxie der Mastzellenentlader eine Kettenreaktion auslöst: 1. Freiwerden von metachromatischen Granula; 2. das metachromatische Material zieht Eisen an; 3. das fixierte Eisen zieht Calcium, Phosphat und wahrscheinlich auch Carbonat an (ebenso wie es das direkt subcutan injizierte Eisen bei der einfachen Calciphyllaxie bewirkt); 4. der Calciumniederschlag legt sich an die benachbarten Bindegewebsfasern an.

Zusammenfassung

An Hand von Rattenversuchen wird nachgewiesen, daß nach Sensibilisierung mit Dihydratysterin (DHT) zwei grundverschiedene Typen von Calciphyllaxie erzeugt werden können: die einfache Calciphyllaxie und die Mastocalciphyllaxie.

Einfache Calciphyllaxie entsteht, wenn man dem sensibilisierten Tier einen Provokator oder „challenger“ (z.B. FeCl_3) subcutan injiziert, da das Eisen unter diesen Umständen Calcium, Phosphat und wahrscheinlich auch Carbonat anzieht. Die Mastzellen sind bei dieser Reaktionsform nicht oder wenigstens nur sehr geringgradig beteiligt.

Eine Mastocalciphyllaxie entsteht, wenn man dem mit DHT sensibilisierten Tier einen metallischen Provokator (z.B. FeCl_3) intravenös injiziert und gleichzeitig einen Mastzellenentlader (z.B. Polymyxin) subcutan verabreicht. Hier löst der Mastzellenentlader eine Kettenreaktion aus, die trotz intravenöser Verabreichung des Provokators eine lokale Verkalkung an der Injektionsstelle hervorruft. Histochemische Untersuchungen lassen es wahrscheinlich erscheinen, daß diese Kettenreaktion in 4 Stadien verläuft: 1. Freiwerden von metachromatischen Granula; 2. das metachromatische Material zieht Eisen an; 3. das fixierte Eisen zieht Calcium, Phosphat und wahrscheinlich auch Carbonat an; 4. der Calciumniederschlag legt sich an die benachbarten Bindegewebsfasern an.

Histochemical Studies on the Role of the Mast Cell in Calciphyllaxis

Summary

Experiments on rats indicate that, following sensitization with dihydratysterol (DHT), two fundamentally distinct types of calciphyllaxis can be produced: simple calciphyllaxis and mastocalciphyllaxis.

Simple calciphyllaxis ensues when a challenger (e.g., FeCl_3) is subcutaneously injected to a sensitized animal; under these conditions the iron attracts calcium, phosphate and probably carbonate. The mastocytes play little or no role in this type of response.

Mastocalciphyllaxis ensues when a DHT-sensitized animal is given a metallic challenger (e.g., FeCl_3) intravenously and, simultaneously, a mast-cell discharger (e.g., polymyxin) subcutaneously. Here, the mast-cell discharger elicits a chain reaction, resulting in topical calcification at the site of injection although the challenger is given systemically. Histochemical studies make it probable that this chain reaction evolves in four stages: 1) Liberation of metachromatic granules; 2) the metachromatic material attracts iron; 3) the fixed iron in turn attracts

calcium, phosphate and probably carbonate; 4) the calcium precipitate becomes attached to the adjacent connective-tissue fibers.

Literatur

SELYE, H.: *Calciphylaxis*. Chicago: The University of Chicago Press 1962.

— G. GABBIANI, and N. SERAFIMOV: Histochemical studies on the role of the mast cell in calcergy. *J. Histochem. Cytochem.* (im Druck, 1964).

— B. TUCHWEBER, and G. GABBIANI: Calcinosis induced by lead acetate. *J. Pharmacol. exp. Ther.* **138**, 131—138 (1962).

Professor Dr. HANS SELYE,
Institut de Médecine et Chirurgie expérimentales,
Université de Montréal, Montréal (Canada)